

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-211727

(43)Date of publication of application : 06.08.1999

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/543

(21)Application number : 10-313811

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22)Date of filing : 04.11.1998

(72)Inventor : HORNAUER HANS DR

SLUKA PETER DR

KARL JOHANN DR

LENZ HELMUT

MUTTER WOLFGANG DR

(30)Priority

Priority number : 97 19748489 Priority date : 03.11.1997 Priority country : DE

### (54) POLYETHYLENE GLYCOL DERIVED BIOMOLECULE AND ITS USE IN HETEROGENEITY DETECTION METHOD

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To partially avoid a prior art defect of decreasing nonspecific binding to a solid phase when a body to be detected in a sample is detected by blocking the solid phase by polyalkylene oxide, particularly, a polyethylene glycol modified nonspecific biomolecule of the body to be detected.

**SOLUTION:** A solid phase includes an optional supporting body, preferably a supporting body with a plastic, glass, metal or metallic oxide surface, or the like porous supporting body. A solid phase reactant can be fixed, e.g. by direct absorption bond, preferably a high-affinity binding body. For this purpose, the solid phase is first coated with a first partner of the high-affinity binding body, on which a conjugate body of the solid phase reactant with a second partner of the binding body is fixed. Preferably, the method includes incubating with an alkylene oxide modified bound molecule acting as a blocking substance, thereby blocking a nonspecific bounding site on the coated solid phase by a specific solid phase reactant of a body to be detected.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-211727

(43) 公開日 平成11年(1999) 8 月 6 日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 0 1

5 2 5

F I

G 0 1 N 33/543

5 0 1 J

5 2 5 W

5 2 5 U

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平10-313811

(22) 出願日 平成10年(1998)11月4日

(31) 優先権主張番号 1 9 7 4 8 4 8 9 : 1

(32) 優先日 1997年11月3日

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 591215177

ベーリンガー マンハイム ゲーエムベー  
ハー

ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム,  
サントホファーシュトラッセ 116

(72) 発明者 ハンス ホーナウワー

ドイツ連邦共和国 ディー-82380 バイ  
センベルグ, ションガウワー シュトラ  
ッセ 102 イー

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエチレングリコール誘導化生体分子及び不均質検出法におけるその使用

(57) 【要約】

【課題】 サンプル中の被検体を検出する際の固相への非特異的結合を減じる方法であって、先行技術の欠点を少なくとも部分的に回避することが可能な新規な方法を提供する。

【解決手段】 被検体の検出方法あるいはそのような方法の適した試薬キットにおけるポリアルキレンオキシド修飾試薬の使用を開示する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 固定された形態で、被検体特異的固相反応物と、ポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合された被検体非特異的生体分子とを含む固相を製造し、(b) サンプルを前記固相及び試験試薬とインキュベートし、(c) サンプル中の被検体の存在及び／又は量を検出する段階を含む、サンプル中の被検体を検出する方法。

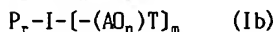
【請求項2】 少なくとも1つの規定された試験領域を有する固相を使用する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 高アフィニティ結合対の第一のパートナーにより被覆され、この上に結合対の第二のパートナーとの被検体特異的固相反応物の抱合体を固定した固相を使用する請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 結合対の第二のパートナーを含むブロッキング物質を使用する請求項3に記載の方法。

【請求項5】 1以上のポリアルキレンオキシド残基が結合対の第二のパートナーに直接結合されたブロッキング物質を使用する請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】 一般構造式(Ia)または(Ib)：



(式中、Pは高アフィニティ結合対のパートナーであり、Iは不活性キャリアであり、rは1から10の数であり、AOは(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)アルキレンオキシド基であり、nは5から500の数であり、Tは好ましくはOH、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ及びC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アシルから選択される末端基であり、mは1~10の数である)の抱合体。

【請求項7】 Pがビオチンまたはビオチン誘導体である請求項6に記載の抱合体。

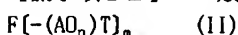
【請求項8】 請求項6または7に記載の抱合体を含むコーティングを有する固相。

【請求項9】 被検体の検出方法における固相への非特異的結合を減少させるための請求項6または7に記載の抱合体の使用。

【請求項10】 他の試験成分に加えて請求項6または7に記載の抱合体あるいは請求項8に記載の固相を含む、被検体の検出のための試薬キット。

【請求項11】 (a) ポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合した修飾固相反応物を使用して固相反応物が固定された固相を製造し、(b) サンプルを固相及び試験試薬とインキュベートし、(c) サンプル中の被検体の存在及び／又は量を検出する段階を含む、サンプル中の被検体を検出する方法。

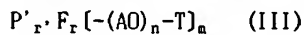
【請求項12】 一般構造式(II)：



(式中、Fはレクチン、ストレプトアビジン、アビジン及び抗ハプテン抗体から選択される高アフィニティ結合対のパートナーである生体分子であり、rは1から10の数であり、AOはC<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-アルキレンオキシド基であり、nは5から500の数であり、Tは好ましくはOH、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキ

シ及びC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アシルから選択される末端基であり、mは1~10の数である)の抱合体。

【請求項13】 一般構造式(III)：



(式中、P'は高アフィニティ結合対のパートナーであり、r'は1から10の数であり、Fは生体分子であり、rは1から10の数であり、AO、n、T及びmは請求項12に定義した通りである)の抱合体。

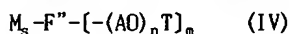
【請求項14】 請求項12または請求項13の抱合体を含む、コーティングを有する固相。

【請求項15】 被検体の測定方法における固相に対する非特異的結合を減少させるための請求項12または13に記載の抱合体の使用。

【請求項16】 他の試験成分に加えて請求項12または13に記載の抱合体、または請求項14に記載の固相を含む、被検体の検出用の試薬キット。

【請求項17】 (a) 被検体特異的受容体を固定した固相を製造し、(b) サンプルを前記固相、及びポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合した被検体特異的修飾可溶性反応物を含む試験試薬とインキュベートし、(c) サンプル中の被検体の存在及び／又は量を検出する段階を含む、被検体を検出する方法。

【請求項18】 一般式(IV)：



(式中、Mは標識基または標識基と反応することができる基であり、sは1~10の数であり、F<sup>s</sup>は測定される被検体に特異的に反応することができる可溶性の生体分子であり、AO、n、T及びmは請求項12に定義した通りである)の抱合体。

【請求項19】 被検体を測定方法における、固相に対する非特異的結合を減少させるための請求項18に記載の抱合体の使用。

【請求項20】 他の試験成分に加えて請求項19に記載の抱合体を含む、被検体の検出用の試薬キット。

【請求項21】 ポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合された物質を含む少なくとも1種の試薬を使用する、サンプル中の被検体を検出する際の固相に対する非特異的結合を減少させる方法。

【請求項22】 ポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合された物質を含む少なくとも1種の試薬を含む、被検体の検出のための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、サンプル中の被検体の検出方法及びそのような方法に適する試薬キットに係わる。

【0002】

【従来の技術】固相を使用するサンプル中の被検体の検出方法は、不均質試験形式と呼ばれている。そのような方法における問題は、サンプルまたは試験試薬の成分が

非特異的に固相に結合することが多く、これにより誤った試験結果が生じることである。この非特異的結合は、体液、例えば血清や血漿からのサンプルにおいて特によく見られる。この非特異的結合を抑制するために、例えばTween 20のような界面活性物質を試薬に加えることができる(WO 88/07683)。さらに、金属表面(Whitesidesら、Science 252 (1991), 1164-1166)、及び酸化物表面(EP-A-0 664 452)を、反応性ポリエチレングリコール誘導体で官能化し、表面の非特異的結合を最小限にできることが知られている。

【0003】非特異的結合を減らすために使用される先行技術の表面活性物質は、それらが固相受容体のような固相に結合する分子を置換し、それにより試験の機能を損なうという欠点を有する。さらに、工業的規模で生産された洗剤表面活性剤は不均質な組成を有し、不純物を含むこともあるが、このようなものが通常は表面活性物質として使用される。結果として生じるバッチの変動により、干渉や再現性のない結果が往々にして生じる。さらに、タンパク質のような感受性がある固相分子の構造は表面活性物質によって攪乱され得、そしてそれらは最終的に変性され得る。

【0004】先行技術により知られるポリエチレングリコールによる金属または酸化物表面の官能化は、ある種の表面に限定される一方、固相表面に適用される生体分子の層に対する非特異的結合を防止するのに十分でないという面もある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、サンプル中の被検体を検出する際の固相への非特異的結合を減少させる方法であって、先行技術の欠点を少なくとも部分的に回避することが可能な新規な方法を提供することであった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の第一の形態は、(a) 固定された形態で、被検体特異的固相反応物と、ポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合された被検体特異的生体分子とを含む固相を製造し、(b) サンプルを前記固相及び試験試薬とインキュベートし、(c) サンプル中の被検体の存在及び／又は量を検出する段階を含む、サンプル中の被検体を検出する方法に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】ポリアルキレンオキシド、特に、ポリエチレングリコール修飾被検体非特異的生体分子で固相をブロックすることにより、同時に有意に試験の感度を劣化させることなく、固相へのサンプル成分の非特異的結合がかなり減少された。ブロッキング試薬は、固相反応物の固定化の間及び／又は後に加えることができる。被検体特異的固相反応物で予備的にコーティングされた固相を、特に好ましくは後に被検体非特異的生体分子でブロックする。

【0008】「規定された試験」領域、即ち不活性な領域により他の試験領域から空間的に隔てられた、固相反応物でコーティングされた規定された領域を有する固相を使用することによって良好な結果が得られた。被検体非特異的プレコーティング、例えばストレプトアビジンで領域全体がコーティングされ、1つの被検体特異的固相反応物上に固定された少くとも1つの空間的に限定された試験領域を含む固相が特に好ましい。規定された試験領域は、好ましくは10μm〜10mmの直径を有する。10μm〜2mmの直径を有する小型化された試験領域が特に好ましい。さらに固相は、異なる被検体特異的固相反応物を含み得る、アレーシステムとも呼ばれる複数の試験領域を有するものが好ましい(例えばアメリカ特許第5,432,099号、第5,516,635号、及び第5,126,276号を参照)。これらのアレーシステムは、1つのサンプルで複数の被検体の測定を同時に行なうことを可能とする。

【0009】本発明の方法における固相は、任意の支持体を含み、プラスチック、ガラス、金属あるいは金属酸化物表面を有する支持体のような非多孔性の支持が好ましい。また、試験ストリップのような多孔性の支持体も適している。被検体特異的固相反応物、即ち、測定される被検体、あるいは競争的な試験形式の場合には測定される被検体の類似体と特異的に相互作用することができる生体分子を固相上に固定する。被検体特異的固相反応物の例としては、抗体、抗原、ペプチド、ハプテン、核酸、核酸類似体、糖タンパク質、糖、リポタンパク質、その他の生体分子等が挙げられる。

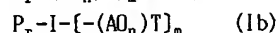
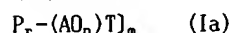
【0010】固相反応物は、公知の方法、例えば、直接の吸着結合、共有結合、あるいは好ましくは高アフィニティ結合対により固定することができる。このためには、固相を最初に高アフィニティ結合対の第一のパートナーで被覆し、そしてこの上に、結合対の第二のパートナーとの固相反応物の抱合体を固定する。適当な高アフィニティ結合対の例としては、ストレプトアビジンあるいはアビジン/ビオチンあるいはビオチン誘導体(例えば、デスチオビオチン、イミノビオチン、アミノビオチン、あるいはストレプトアビジンもしくはアビジンに対して高いアフィニティで結合できるその他の物質)、抗体/ハプテン(例えば、ジゴキシゲニン、フルオレセイン等)、抗体/抗原(例えば、ペプチドあるいはポリペプチド)、レクチン/糖、及び受容体/リガンド(例えば、ホルモン受容体/ホルモン)等が挙げられる。ストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチンは高アフィニティ結合対として特に好ましく使用される。

【0011】本発明の方法は、好ましくは、ブロッキング物質として作用するアルキレンオキシド修飾結合分子とインキュベートすることにより被検体特異的固相反応物で既に被覆された固相上の非特異的結合部位をブロッキングすることを含む。インキュベートの持続期間と温度は広い範囲内で変化させることができ、例えば4℃〜4

0°Cのインキュベーション温度及び1分～1時間のインキュベーション時間とすることができる。

【0012】適するブロッキング物質は、固相に結合ができ、検出方法に干渉しない被検体非特異的または不活性生体分子であり、例えばアルブミンのようなタンパク質、非特異的抗体もしくはその断片、あるいはデキストリンのような多糖類等である。ブロッキング物質は、吸着または共有結合による相互作用で固相に結合されることができる。しかし、高アフィニティ結合対による結合が好ましい。特に、高アフィニティ結合対によって固定された固相反応物を含む固相の場合、例えば1以上のポリアルキレンオキシド残基を含むビオチン化されたタンパク質のような結合対の第二のパートナーを含むブロッキング物質が好ましく使用される。あるいは、1以上のポリアルキレンオキシド残基が結合対の第二のパートナーに直接結合されたブロッキング物質を使用することも好ましい。

【0013】好ましいブロッキング物質は、一般構造式(Ia)または(Ib)：



の抱合体である。式中、Pは高アフィニティ結合対のパートナーであり、Iは生体分子であり、rは1から10の数であり、AOは(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)アルキレンオキシド基であり、nは5から500の数であり、Tは好ましくはOH、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ及びアシルから選択される末端基であり、mは1～10の数である。

【0014】Pは、好ましくはハプテン、ビオチンまたはビオチン誘導体である。Pは、特に好ましくはビオチンまたはビオチン誘導体である。Iは、好ましくはポリペプチドまたは糖である。式(Ia)の抱合体中、rは好ましくは1である。AOは、(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)アルキレンオキシド基、即ちエチレンオキシド及び／又はプロピレンオキシド基とすることができる。AOは好ましくはエチレンオキシド基であるが、エチレンオキシドとプロピレンオキシド基の組み合わせも適している。nは好ましくは10～250の数であり、特に好ましくは20～200である。

【0015】Tは、その他の試験及びサンプル成分と適合する、即ち望ましくない反応を有意に導入しない末端基(ポリオキシアルキレン単位の末端O原子を含む)である。好ましくは、Tはヒドロキシ基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルエテル基、特にメトキシ、あるいはC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アシル基、例えばアセチル基である。構造式(Ia)の抱合体中、mは好ましくは1である。

【0016】構造式(Ia)及び(Ib)の抱合体は、検出法におけるブロッキング試薬として好ましく使用される。固相上への固定化の後、それらは好ましくはサンプルまたは試験試薬中の溶解した生体分子に成分Pを介して高いアフィニティで結合することができなくなるものである。本発明の別の主題は、1以上の抱合体(Ia)及び／又

は(Ib)と好ましくは被検体特異的固相反応物を含むコーティングを有する固相である。本発明の抱合体を使用して、例えば免疫学的方法あるいは核酸ハイブリダイゼーション法におけるような、被検体の検出方法における固相への非特異的結合を減少させることができる。本発明の第一の形態の別の主題は、他の試験成分に加えて本発明の抱合体あるいは本発明の固相を含む、被検体の検出のための試薬キットである。

【0017】特に好ましい態様においては、1つの鎖端においてビオチン残基で官能化されたPEG鎖であるビオチンポリエチレングリコール化合物を使用する。他の鎖端は、好ましくはヒドロキシルまたはメトキシ基を有する。ビオチン-PEG抱合体は、ビオチン化被検体特異的固相反応物、例えば抗体の後あるいは同時に、ストレプトアビジン固相に適用される。抱合体は、依然として接近できるストレプトアビジン固相の遊離のビオチン結合部位に結合する。非結合ビオチン-PEG抱合体は洗浄によって除去することができる。得られる固相は、機能を害することなくこの状態で乾燥することができる。本発明の抱合体で処理された表面の非特異的結合は、未処置の表面と比較して、あるいは非アルキレンオキシド修飾ブロッキング物質で処理された表面と比較して大きく減少する。別の利点は、本発明の固相がブロッキング抱合体で処理することもでき、従って固相反応物の適用の後に所望の特性を与えることができることである。規定された試験領域と連続的なプレコーティングを有する固相においては、試験領域のみならずそれらの試験領域の外部(例えば、空のストレプトアビジン固相)において、非特異的結合がかなり減少する。固相の被検体を結合する能力は、驚くほど影響を受けていないままに残る。

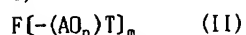
【0018】本発明の二番目の形態は、(a) ポリ(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-アルキレンオキシドに結合した修飾固相反応物を使用して固相反応物が固定された固相を製造し、(b) サンプルを固相及び試験試薬とインキュベートし、(c) サンプル中の被検体の存在及び／又は量を検出する段階を含む、サンプル中の被検体を検出する方法である。

【0019】本発明のこの二番目の形態によれば、ポリアルキレンオキシド-修飾された固相反応物を固相上に固定する。一方で、修飾固相反応物は、汎用性のある固相反応物、即ち被検体と特異的に反応することができないが、固相上に共有結合、吸着、あるいは高アフィニティ結合対により固定された別の固相反応物と反応できる反応物とすることができる。汎用性のある固相反応物の例としては、例えば、ビオチン化されたあるいはハプテン-抱合被検体特異的な別の固相反応物と反応することができる、ストレプトアビジンあるいは抗ハプテン抗体が挙げられる。また、他方、あるいはその上に、被検体特異的固相反応物はポリアルキレンオキシド-修飾固相反応物とすることができる。

【0020】汎用性のある修飾固相反応物は、例えば高

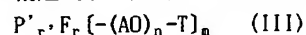
アフィニティ結合対のパートナーあるいは高アフィニティ結合対のパートナーとの被検体非特異的生体分子の抱合体とすることができる。それ自体が高アフィニティ結合対のパートナーである汎用性のある固相反応物の例としては、ストレプトアビジン、アビジン、ハプテン特異的抗体、レクチン、それらのポリマー抱合体等のようなポリペプチドが挙げられる。一方、高アフィニティ結合対のパートナーとの被検体非特異的生体分子の抱合体、例えばビオチン、ビオチン誘導体、ハプテンあるいは糖に結合された不活性なポリペプチドあるいは多糖を、汎用性のある固相反応物として使用することもできる。

【0021】被検体特異的修飾固相反応物を使用する場合でも、これが高アフィニティ結合対のパートナーとの抱合体であることが好ましい。そのような被検体特異的修飾固相反応物の例としては、被検体特異抗体、抗原、核酸、核酸類似体、レクチン等が挙げられる。本発明の二番目の形態の1つの態様においては、一般構造式(I)：



の抱合体を使用する。式中、Fはレクチン、ストレプトアビジン、アビジン及び抗体から選択されるポリペプチドであり、rは1から10の数であり、AOは $C_2-C_3$ -アルキレンオキシド基であり、nは5から500の数であり、Tは好ましくはOH、 $C_1-C_4$ アルコキシ及び $C_1-C_4$ アシルから選択される末端基であり、mは1~10の数であり、前記抱合体は、好ましくは、固相上への抱合体の固定化の後なお高いアフィニティで可溶性反応物に結合することができる少なくとも1つの結合部位を有するものである。

【0022】さらに別の好ましい態様においては、一般構造式(III)の抱合体を使用する。



式中、P'は高アフィニティ結合対のパートナーであり、r'は1から10の数であり、Fは生体分子であり、rは1から10の数であり、AO、n、T及びmは構造式(II)の抱合体について定義した通りである。

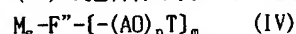
【0023】構造式(II)及び(III)の抱合体は、検出法において汎用性のあるあるいは被検体特異的な固相反応物として好ましく使用される。また、本発明の二番目の形態は、一般構造式(II)及び／又は(III)の抱合体を含むコーティングを有する固相に係わる。抱合体は、例えば免疫学的方法あるいは核酸ハイブリダイゼーション法のような被検体の測定方法における固相に対する非特異的結合を減少させるために使用することができる。本発明の二番目の形態はさらに、他の試験成分に加えて一般構造式(II)及び／又は(III)の抱合体、またはそのような抱合体でコーティングされた固相を含む、被検体の検出用の試薬キットに関する。

【0024】本発明の三番目の形態は、(a) 被検体特異的固相反応物を固定した固相を製造し、(b) サンプルを前記固相、及びポリ( $C_2-C_3$ )-アルキレンオキシドに結合

した被検体特異的修飾可溶性反応物を含む試験試薬とインキュベートし、(c) サンプル中の被検体の存在及び／又は量を検出する段階を含む、サンプル中の被検体を検出する方法に関する。

【0025】本発明のこの形態においては、修飾された可溶性の被検体特異的反応物、即ち、測定される被検体及び／又は被検体類似体に特異的に結合することができる生体分子を使用する。修飾された可溶性の反応物は直接標識することができ、即ち、例えば酵素、蛍光、電気化学発光標識基を有することができる。一方、可溶性の反応物は間接的に標識することもでき、即ち検出可能な標識基と反応する基を有するものであり、例えば標識抗ハプテン抗体と反応できるハプテンを有するものとする。

【0026】修飾された可溶性の反応物は、好ましくは抗体、抗原、核酸、核酸類似体及びレクチンから選択される。本発明のこの三番目の形態によれば、一般構造式(IV)の抱合体が好ましく使用される。



式中、Mは標識基または標識基と反応することができる基であり、sは1~10の数であり、F'は特に、抗体、抗原、核酸、核酸類似体及びレクチンから選択される可溶性の生体分子であり、AO、n、T及びmは構造式(II)の抱合体について定義した通りである。

【0027】これらの抱合体は、被検体を測定するための方法、特に、免疫学的測定方法、核酸ハイブリダイゼーション法あるいは糖-レクチン測定法において、固相に対する非特異的結合を減少させるために使用することができる。さらに、本発明のこの三番目の形態は、他の試験成分に加えて一般式(IV)の抱合体を含む被検体の検出用の試薬キットに関する。

【0028】本発明の四番目の形態は、ポリ( $C_2-C_3$ )-アルキレンオキシドに結合された物質を含む少なくとも1種の試薬を使用することを特徴とする、サンプル中の被検体を検出する方法において固相に対する非特異的結合を減少させる方法に関する。ポリ( $C_2-C_3$ )-アルキレンオキシドに結合される物質は、好ましくは、(i) ブロッキング物質、(ii) 汎用性のある固相反応物、(iii) 被検体特異的固相反応物、及び(iv) 可溶性反応物から選択される。

【0029】前記方法においては1種より多い物質のアルキレンオキシド修飾種を使用することが好ましい。本発明のこの四番目の形態の一つの主題は、好ましくは前に挙げた物質種の1種から選択されるポリ( $C_2-C_3$ )-アルキレンオキシドに結合された物質を含む少なくとも1種の試薬を含む、被検体の検出のための試薬キットである。

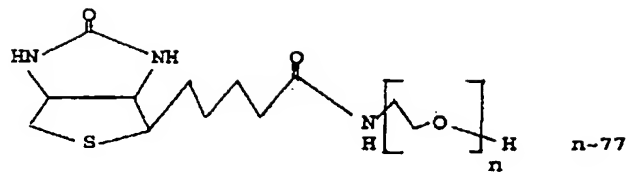
【0030】本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

【0031】

【実施例】1. ビオチン-ポリエチレングリコール(PEG)抱

合体(MW 3499)の合成  
【0032】

## 【化1】



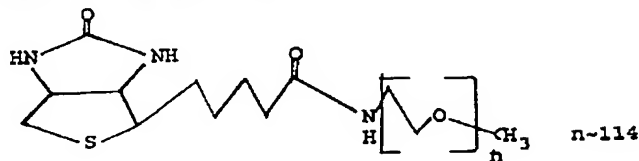
【0033】550 mgの1-アミノ-PEG(Shearwater Polymers Co.)を10 mlのジオキサンに溶解した。60 mgのトリエチルアミンをこの溶液に加え、その後、100 mgのビオチン-OSu-エステル(Boehringer Mannheim)を加えた。混合物を2.5時間室温で攪拌した。その後生成物をカラムクロマトグラフィーによって精製した。収量は30%であ

った。

2. ビオチン-メトキシポリエチレングリコール抱合体(MW 5000)の合成

## 【0034】

## 【化2】



【0035】150 mgのアミノメトキシ-PEG(Sigma Co.)を100 mlのジオキサンに溶解し、その後60 mlのDMFに溶解した2 gのビオチン-OSu-エステルを加えた。40 mgのトリエチルアミンを添加した後、3時間室温で、その後さらに3時間70℃で攪拌した。溶媒をその後除去し、生成物をカラムクロマトグラフィーによって精製した。収量は57%であった。

### 3. ビオチン-PEG固相の製造

TSHに対するビオチン化抗体を、約0.1 mmの直径の領域の形態で、微細投与法によりストレプトアビジン固相(熱重合されたウシ血清アルブミン(BSA)に結合したストレプトアビジンでコーティングされたp-スチレン)に適用した。抗体領域の適用の後、この固相を50 μg/mlのBi-PEGを含むリン酸バッファーpH 7.5で再処理した。これを2分間インキュベートした後、再洗浄し、乾燥した。

4. Bi-PEGでコーティングされた固相に対する非特異的結合の分析

実施例3に記載した方法によって製造した固相を下記のようにして評価した。被検体を含まないサンプル物質(p24-非含有ヒト血清あるいはEnzymun(登録商標)-TSH 0標準)とのインキュベート及びその後の洗浄段階の後、ヒト血清とインキュベートした固相を、ジゴキシゲニン化検出試薬とともにインキュベートした(p24-Dig抱合体、及び抗ヒトIgG-抗体-Dig抱合体と)。これらのジゴキシゲニン化試薬はTSH抗体に対して特異的でなく、即ちそれらは被検体を含まないが、非特異的結合のレベルの認識を有する。洗浄段階の後、抗Dig抗体で標識した蛍光染色ラテックスにより非特異的結合を測定した。蛍光顕微鏡法により得られたシグナルを光学画像評価によって定量化し、カウント/秒として表した。試験領域内(ビオチン化されたTSH抗体を含む)、及び試験領域の外側(抗体コーティングのないバックグラウンド)の蛍光強度を測定した。

## 【0036】

【表1】

表1: カウント/秒で表した試験領域(TSH抗体を含む)における結果

固相	検出試薬		
	TSH 0標準	p24-Dig	(h-IgG)-Dig
Bi-PEGなし	65	1897	1612
Bi-PEGあり	31	740	1231

## 【0037】

## 【表2】



表2: カウント/秒で表したバックグラウンド(ストレプトアビジン固相)における結果

固相	検出試薬		
	TSH 0標準	p24-Dig	(h-IgG)-Dig
Bi-PEGなし	51	766	654
Bi-PEGあり	17	136	140

【0038】 全ての場合において、Bi-PEGの添加により固相上の非特異的結合がかなり減少した。

#### 5. ストレプトアビジン-ポリエチレングリコール抱合体の合成

ストレプトアビジン及びPEG-OSuをリン酸バッファーに溶解し、それぞれの場合について所望の化学量論、好ましくは1:1～1:5で添加して合わせた。2時間の室温での反応後(?)、反応混合物を0.05%アジ化ナトリウムを含むリン酸バッファーに対して透析し、4℃で貯蔵した。

#### 6. 汎用性のあるストレプトアビジン-PEG固相の製造

100 $\mu$ g/mlの濃度のビオチン化キャリアタンパク質(BS A-ビオチンまたはサーモ-BSA-ビオチン)を含む溶液で反応容器を満たし、5分間室温でインキュベートした。その後溶液を吸引し、コーティングされた反応容器をリン酸バッファーで洗浄し、再度吸引した。その後、ストレプトアビジン-PEGを1% BSAを含むリン酸バッファー中50 $\mu$ g/mlの濃度で加え、15分間インキュベートした。その後溶液を吸引し、1%BSA及び2%スクロースを含むリン酸バッファーを加えて洗浄した。再度吸引し乾燥した後、固相を気密の包装中で4℃で貯蔵した。

#### 7. 特異的なストレプトアビジン-PEG固相の製造

100 $\mu$ g/mlの濃度のビオチン化キャリアタンパク質を含む溶液で反応容器を満たし、5分間室温でインキュベートした。溶液を吸引し、リン酸バッファーで洗浄し、

再度吸引した。その後、1% BSAを含むリン酸バッファー中のストレプトアビジン-PEG(50 $\mu$ g/ml)を加え、15分間インキュベートした。溶液を吸引し、リン酸バッファーで洗浄し、再度吸引した。

【0039】 その後、例えばモノクローナル抗TSH抗体Fab<sub>2</sub>断片(5 $\mu$ g/ml)のようなビオチン化抗体を加え、15分間インキュベートした。溶液を吸引し、1%BSA及び2%スクロースを含むリン酸バッファーを加えて洗浄し、再度吸引した。乾燥した後、固相を気密の包装中で4℃で貯蔵した。

#### 8.1 ストレプトアビジン-PEG固相の評価

実施例6または7からの固相を含む反応容器を、予備希釈した被検体非含有サンプル(ローディングバッファー50mMトリス/HCl pH 7.5、0.5% BSA、0.05% Tween20、0.9% NaClで1:1に希釈したウマ血清)とともに20分間室温でインキュベートした。洗浄の後、それをシグナル抗体(ローディングバッファー中1 $\mu$ g/mlのモノクローナル抗TSH抗体IgG-ジゴキシゲニン抱合体)の存在下に20分インキュベートし、再度洗浄した。

【0040】 検出試薬(モノクローナル抗ジゴキシゲニン抗体IgGでコーティングしたフルオロビーズの0.01%溶液)を添加した後、20分インキュベートし、洗浄し、蛍光シグナルを測定した。

【0041】

【表3】

表3: 種々の固相上での蛍光プランク値(任意単位)

	非特異的固相	特異的固相
SA非誘導化	199	373
SA-PEG (1:1)	114	114
SA-PEG (1:5)	(100)	(100)

#### 8.2 バッファー成分の非特異的結合

実施例6または7からの固相を含む反応容器を、実施例8.2において記載したウマ血清サンプルで満たし、洗浄した。その後ローディングバッファー中の0.2 $\mu$ g/mlのp24-ジゴキシゲニンを加え、20分間インキュベートし、洗

浄した。そして検出試薬(8.1参照)を加え、再び20分間インキュベートし、洗浄し、蛍光シグナルを測定した。結果を表4に示す。

【0042】

【表4】

表4：種々の固相上でのp24-ジゴキシゲニンの非特異的結合  
(任意単位)

	非特異的固相	特異的固相
SA非誘導化	691	( $\sim$ 1500)
SA-PEG (1:1)	260	660
SA-PEG (1:5)	124	365

## 8.3 ヒトIgG抗体の非特異的結合

実施例6及び7で製造した固相を含む反応容器を、実施例8.1に記載したサンプルで満たし、洗浄した。サンプルはローディングバッファーで1:19に希釈したヒト血清であった。

【0043】その後、ローディングバッファー中1.0 $\mu$ g

/mlのモノクローナル抗ヒトIgG抗体-ジゴキシゲニン抱合体を加え、洗浄した。次いで検出試薬を加え、20分間インキュベートし、再び洗浄し、蛍光シグナルを測定した。結果を下記表5に示す。

【0044】

【表5】

表5：種々の固相上でのヒト抗体の非特異的結合(任意単位)

	非特異的固相	特異的固相
SA非誘導化	2549	( $\sim$ 3000)
SA-PEG (1:1)	944	1749
SA-PEG (1:5)	515	834

## 9. 抗体-PEG抱合体の製造

ストレプトアビジンの代わりにビオチン化抗体を使用したことを除いて実施例5に記載したようにPEG-抗体抱合体を製造した。

## 10. PEG-抗体抱合体で被覆した固相の製造

反応容器に100  $\mu$ g/mlのビオチン化キャリアタンパク質(BSA-ビオチンまたはtBSA-ビオチン)を含む溶液を入れ5分間インキュベートした。その後溶液を吸引し、リン酸バッファーで洗浄し、再度吸引した。

【0045】その後1% BSAを含むリン酸バッファー中の50 $\mu$ g/mlのストレプトアビジンを加え、15分間インキュベートした。溶液を吸引し、リン酸バッファーで洗浄

し、再度吸引した。その後5 $\mu$ g/mlのビオチン化IgG抗体、例えばモノクローナル抗TSH-Fab'<sub>2</sub>抗体断片を加え、15分間インキュベートした。溶液を吸引し、1%BSA及び2%スクロースを含むリン酸バッファーで洗浄する段階を行った。再度吸引した後、容器を乾燥し気密の包装中で4℃で貯蔵した。

## 11. 評価

## 11.1 ブランク値

実施例10で製造した固相のブランク値を実施例8.1に記載したように測定した。結果を表6に示す。

【0046】

【表6】

表6：種々の固相上での蛍光ブランク値(任意単位)  
シグナル(任意単位)

AB非誘導化	270
AB-PEG (1:1)	94
AB-PEG (1:5)	57

## 11.2 バッファー成分の非特異的結合

実施例10で製造した固相に対するバッファー成分の非特異的結合を実施例8.2に記載したように測定した。結果

を表7に示す。

【0047】

【表7】

表7: 種々の固相上でのp24-ジゴキシゲニンの非特異的結合  
(任意単位)

	特異的固相
AB非誘導化	26658
AB-PEG (1:1)	23519
AB-PEG (1:5)	7998

## 11.3 ヒト抗体(IgG)の非特異的結合の測定

実施例10で製造した固相に対するヒトIgG抗体の非特異的結合の測定を実施例8.3に記載したように行った。結

果を表8に示す。

【0048】

【表8】

表8: 種々の固相上でのヒト抗体の非特異的結合(任意単位)

	特異的固相
AB非誘導化	11379
AB-PEG (1:1)	10475
AB-PEG (1:5)	4446

## 実施例12

<HIV I>;試験のための手順と陰性サンプルによる試験結果

HIV Iウイルスのgp41を提示する抗原を、ポリスチレン支持体上の約100 $\mu$ mの直径の試験領域に適用した。サンプルバッファーで予備希釈した30 $\mu$ lのサンプルを試験領域上にピペットで取り、震盪しながら室温で20分間インキュベートした。サンプルを吸引し、洗浄バッファーで試験領域を洗浄した後、HIV I抗原を提示するDig-標識されたgp41を含む30 $\mu$ lの試薬溶液をピペットで加え、それを震盪しながら再度室温で20分間インキュベートした。試薬溶液を吸引し、洗浄バッファーで試験領域を洗浄した後、30 $\mu$ lの検出試薬を試験領域上にピペットで加えた。抗-Dig抗体で共有結合により被覆された10

0 nmのサイズの蛍光染色ラテックス粒子が検出試薬となる。

【0049】次にこの検出試薬を震盪しながら20分間室温でインキュベートし、その後吸引し、洗浄し、吸引により乾燥した。試験領域を633 nmの波長のHeNeレーザーにより照射し、波長670 nmの蛍光をCCDカメラで測定した。以下の試験-特異的試薬を使用した。

固相抗原: gp41ペプチドからなるポリハプテン

検出抗原: Digにより標識されたgp41ペプチドからなるポリハプテン

以下の測定値(カウント)を測定した。

【0050】

【表9】

サンプル	バックグラウンド* [カウント]	シグナル 試験領域 [カウント]	シグナル 試験領域 バックグラウンド	カットオフ 指標**
陰性対照	148	148	0	0.0
陽性サンプル 1	178	26435	26257	88.1
陽性サンプル 2	172	22908	22376	76.8
陰性サンプル 1	101	101	0	0.0
陰性サンプル 2	103	103	0	0.0
陰性サンプル 3	93	93	0	0.0
陰性サンプル 4	98	98	0	0.0
陰性サンプル 5 (S441)	86	4401	4315	14.6
陰性サンプル 6 (S480)	137	2690	2553	8.6
陰性サンプル 7 (S486)	107	3833	3726	12.6
陰性サンプル 8 (S520)	116	4331	4215	14.2

\* バックグラウンドは試験領域に付着しているシグナルに対応する。

\*\* カットオフ指標 =  $\frac{\text{シグナル}_{\text{サンプル}} - \text{シグナル}_{\text{バックグラウンド}}}{2 \times \text{シグナル}_{\text{陰性対照}}}$

カットオフ指標 < 1 = 陰性

【0051】上記の表は、特異性試験から抽出したものを示す。約240の<HIV I>陰性サンプルをこの試験において測定した。大部分のサンプル(例えば陰性サンプル1~4)は試験領域上で反応を示さず、従って明らかに陰性であった。しかし、4つのサンプル(陰性サンプル5~8)が試験領域上で強い非特異的反応を示したことが見出され、従って偽陽性として検出された。

実施例13

PEG-誘導化固相抗原による特異性の改良

この実験においては<HIV I>試験を実施例12と同様に行った。それに対し、1:1の化学量論的割合のPEG 500により誘導化された同じ抗原をHIV I抗原の次に同じ試験支持体にさらに適用した。

【0052】以下の測定値が得られた。

【0053】

【表10】

サンプル	バックグラウンド* [カウント]	ポリハプテン-gp41-ペプチド		ポリハプテン-gp41-ペプチド-PEG	
		カウント**	COI***	カウント**	COI***
陰性対照	52	0	0.0	31	0.3
陽性対照	63	286	2.0	8383	80
陽性サンプル 1	212	11752	111	6227	57.8
陽性サンプル 2	84	1632	14.9	3762	35.3
S441	50	1061	9.7	79	0.3
S480	53	871	7.9	102	0.5
S486	44	1041	9.6	98	0.5
S520	44	1260	11.7	84	0.4

\* バックグラウンドは試験領域に付着しているシグナルに対応する。

\*\* シグナル<sub>サンプル</sub> - シグナル<sub>バックグラウンド</sub>

\*\*\* COI = カットオフ指標 =  $\frac{\text{シグナル}_{\text{サンプル}} - \text{シグナル}_{\text{バックグラウンド}}}{2 \times \text{シグナル}_{\text{陰性対照}}}$

陰性対照

カットオフ指標 < 10 陰性

【0054】この結果は、<HIV I>試験領域における干渉サンプルの非特異的結合が、新規なPEG-誘導化抗原を使用することによって実質的に減少され、全ての4つの

干渉サンプルが陰性となっていることを示している。驚くべきことに、PEG-誘導化はさらに陽性サンプルのシグナルの強い増加をもたらすこともできた(陽性対照及び

陽性サンプル1を参照)。

#### 14. HBs-抗原の検出

HBs抗原に対するモノクローナル抗体を、ポリスチレン支持体上の約100 $\mu$ mの直径の試験領域に適用した。PEG抱合体(製造実施例9)の形態の同じ抗体を別の試験領域に適用した。サンプルバッファーで予備希釈した30 $\mu$ lのサンプルを試験領域上にピペットで加え、震盪しながら20分間室温でインキュベートした。サンプルを吸引し、洗浄バッファーで試験領域を洗浄した後、ジゴキシゲニン標識した抗HBsAg抗体を含む30 $\mu$ lの試薬溶液をピペットで加え、それを震盪しながら20分間室温で再度インキュベートした。溶液を吸引し、洗浄バッファーで試

験領域を洗浄した後、30 $\mu$ lの検出試薬(実施例8.3)を試験領域上にピペットで加えた。

【0055】検出は実施例8.1に記載したようにして行った。陽性標準、陰性標準、並びにHBsAgを含まないがそれにもかかわらず固相との被検体非特異的相互作用によりこの試験において有意な陽性シグナルを示す5つの陰性血清について調べた。これらの実験の結果を表11に示す。PEG誘導化抗体の非特異的結合が未処理の抗体のものよりも非常に低いことが明らかに判る。

【0056】

【表 1 1】

測定シグナル		
サンプル	MAB(HBs)	MAB(HBs)PEG
陽性標準	1080	960
陰性標準	1.3	1.7
陰性血清1	16	3.4
陰性血清2	28	12
陰性血清3	15	1.3
陰性血清4	11.5	2
陰性血清5	18	9

【0057】

【発明の効果】本発明により、サンプル中の被検体の検出方法及びそのような方法に適する試薬キットが提供さ

れる。本発明の方法によれば、サンプル中の被検体を検出する際の固相への非特異的結合を減じることができ

フロントページの続き

(72)発明者 ベーター スルカ  
ドイツ連邦共和国 ディー-82362ヴァイ  
ルハイム、シュトラーセ-アナ ヴェク  
17  
(72)発明者 ヨハン カール  
ドイツ連邦共和国 ディー-82380パイセ  
ンベルグ、ベルト-シュラツルセ-ルーシ  
ュトラーセ 7

(72)発明者 ヘルムット レンズ  
ドイツ連邦共和国 ディー-82327トゥツ  
ィング、ボン-クールマン-シュトラーセ  
14  
(72)発明者 ウォルフガング マター  
ドイツ連邦共和国 ディー-82347ベルン  
リード、アム ニューランド 7